

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

21.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年10月22日
Date of Application:

REC'D 09 DEC 2004

WIPO

PCT

出願番号 特願2003-361639
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-361639]

出願人 武田薬品工業株式会社
Applicant(s):

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月25日

小川

洋

出証番号 出証特2004-3106809

【書類名】 特許願
【整理番号】 B03221
【提出日】 平成15年10月22日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市春日2丁目35-10
【氏名】 松本 寛和

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市二の宮10-19-I-205
【氏名】 野口 次郎

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市竹園1丁目8-14-906-210
【氏名】 増田 安司

【特許出願人】
【識別番号】 000002934
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】
【識別番号】 100114041
【弁理士】
【氏名又は名称】 高橋 秀一

【選任した代理人】
【識別番号】 100106323
【弁理士】
【氏名又は名称】 関口 陽

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 005142
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9909276
【包括委任状番号】 0203423

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列の、第8～9、11、15、17、21、23、25～28、30、34、36～37、39～40、44～46、48、52～53、55、64、66、68、70～73、75～76または78～81番目のアミノ酸を含有するペプチドに特異的に反応する請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを認識しない請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

標識化された請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

ZAL2-103 (FERM BP-8431) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るZAL2-103aで標示される請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

ZAL2-106 (FERM BP-8432) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るZAL2-106aで標示される請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに対して中和活性を有する請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

請求項1記載のモノクローナル抗体を含有してなる医薬。

【請求項 9】

請求項1記載のモノクローナル抗体を含有してなる診断薬。

【請求項 10】

請求項1記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

【請求項 11】

請求項1記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩が関与する疾患の診断法。

【請求項 12】

請求項1記載のモノクローナル抗体と、被検液および標識化された配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたポリペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

【請求項 13】

(a) 担体上に不溶化した請求項5記載のモノクローナル抗体、標識化された請求項6記載のモノクローナル抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定する、または

(b) 担体上に不溶化した請求項6記載のモノクローナル抗体、標識化された請求項5記載のモノクローナル抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

【請求項 14】

請求項1記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

【請求項 15】

ZAL2-103 (FERM BP-8431) またはZAL2-106 (FERM B
P-8432) で標示される請求項14記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項16】
請求項14記載のハイブリドーマ細胞を生体内又は生体外で培養し、その体液または培養
物から請求項5または請求項6記載のモノクローナル抗体を採取することを特徴とする請
求項5または請求項6記載のモノクローナル抗体の製造法。

体、

(6) ZAL2-106 (FERM BP-8432) で標示されるハイブリドーマ細胞から產生され得るZAL2-106aで標示される上記(1)記載のモノクローナル抗体、

(7) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに対して中和活性を有する上記(1)記載のモノクローナル抗体、

(8) 上記(1)記載のモノクローナル抗体を含有してなる医薬、

(9) 上記(1)記載のモノクローナル抗体を含有してなる診断薬、

(10) 上記(1)記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

(11) 上記(1)記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩が関与する疾患の診断法、

(12) 上記(1)記載のモノクローナル抗体と、被検液および標識化された配列番号

：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたポリペプチドまたはその塩の割合を測定すること、またはその塩の定量法、

(13) (a) 担体上に不溶化した上記(5)記載のモノクローナル抗体、標識化された上記(6)記載のモノクローナル抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定する、または、

(b) 担体上に不溶化した上記(6)記載のモノクローナル抗体、標識化された上記(5)記載のモノクローナル抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定すること、またはその塩の定量法、

(14) 上記(1)記載のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞、

(15) ZAL2-103 (FERM BP-8431) またはZAL2-106 (FERM BP-8432) で標示される上記(14)記載のハイブリドーマ細胞、

(16) 上記(14)記載のハイブリドーマ細胞を生体内又は生体外で培養し、その液体または培養物から上記(5)または上記(6)記載のモノクローナル抗体を採取することを特徴とする上記(5)または上記(6)記載のモノクローナル抗体の製造法などを提供する。

【発明の効果】

【0006】

本発明の抗体は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩への極めて高い結合能を有し、かつ配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇活性を中和することができ、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の作用を抑制することにより、例えば、消化器疾患（例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）、睡眠障害（例、原発性不眠、概日リズム障害（例、三交替勤務等による体調の変調、時間帯域変化（例、老人性痴呆、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など）、脳循環障害（例、脳卒中など）、老化に伴う各種傷害、精神疾患（例、不安、鬱病、不眠症、統合失調症、恐怖症など）、てんかん、アルコール依存症、高血圧症、動脈硬化、不整脈、月経前緊張症候群（時差ボケ）など）、季節鬱病、生殖機能障害、内分泌疾患、中枢神経疾患（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満症、過インシュリン性肥満症、下垂体性肥満、減血症（例、悪性肥満症）、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満症、症候性肥満症、小児肥満、上半身漿性肥満症、性機能低下性肥満症、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）などの予防・治療剤として有用である。また、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩を発現している癌を見出し、本発明の抗体を用いたミサイル療法による抗癌治療も可能である。本発明の2種のモノクローナル抗体を用いる

サンドイッチ法による免疫学的測定法により、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含むするポリペプチドまたはその塩を感度よく特異的に定量することができるため、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の生理機能および病態との解明に有用である。さらに、血液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の濃度を測定することにより、例えば、上記疾患などの診断も可能である。また、本発明の抗体は、上記ポリペプチドの免疫組織染色にも使用可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本明細書におけるタンパク質（ポリペプチド）は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基、カルボキシレート、アミドまたはエステルの何れであってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列に数（1～5）個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列に数（1～5）個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の数（1～5）個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが用いられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔴酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0008】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に特異的に反応するモノクローナル抗体（以下、本発明の抗体と称することもある）としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩に特異的に反応するモノクローナル抗体などが挙げられ、好ましくは配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩に特異的に反応するモノクローナル抗体などが挙げられる。

本発明の抗体は、好ましくは、配列番号：1で表されるアミノ酸配列の、第8～9、11、15、17、21、23、25～28、30、34、36～37、39～40、44～46、48、52～53、55、64、66、68、70～73、75～76または7～81番目のアミノ酸を含有するペプチドに特異的に反応し、配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識しない。

さらに好ましくは、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を中和する抗体である。

具体例としては、ZAL2-103aまたはZAL2-106aで標示されるモノクローナル抗体などが挙げられる。

【0009】

以下に、本発明の抗体の抗原の調製法、および該抗体の製造法について説明する。

（1）抗原の調製

本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩と同一の抗原決定基を1種あるいは2種以上有する（合成）ペプチドなど何れのものも使用することができる（以下、これらを単にヒトZAQL-2抗原と称することもある）。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩は、公知の方法、例えばWO 02/62944号公報に記載の方法に準じて製造でき、さらに、(a) 例えればヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物の組織または細胞から公知の方法あるいはそれ等を用いて調製、(b) ペプチド・シンセサイザー等を使用する公知のペプチド合成方法で化学的に合成、(c) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造される。

製造される。
(a) 該哺乳動物の組織または細胞からヒトZQL-2抗原を調製する場合、その組織または細胞をホモジナイズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離

(b) 化学的にヒトZAQL-2抗原を調製する場合、該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製したヒトZAQL-2抗原と同一の構造を有するもの、配列番号：1で表されたアミノ酸配列において3個以上、好ましくは6個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を1種あるいは2種以上含有するペプチドなどが用いられる。

れる。
(c) DNAを含有する形質転換体を用いて配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する
ポリペプチドまたはその塩を製造する場合、該DNAは、公知のクローニング方法〔例えば
、Molecular Cloning (2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press,
1989) に記載の方法など〕に従って作製することができる。該クローニング方法とは、
(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のアミ
ノ酸配列に基づきデザインしたDNAプローブまたはDNAプライマーを用い、cDNAライブライ
ーからハイブリダイゼーション法により配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する
ポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法、または
(2) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のアミ
ノ酸配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、PCR法により配列番号：1で表される
アミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換
体を得る方法などが挙げられる。

[0 0 1 0]

ヒトZQL-2抗原としてのペプチドは、(1)公知のペプチドの合成法に従って、また、(2)配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することもできる。

該ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによても良い。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下に記載された方法等が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966年)
 (ii) M. Bodanszky, The Peptide, Academic Press, New York (1965年)

(ii) Schroeder および Luebke, *The Peptide*, Academic Press, New York (1965年)

(ii) Schroeder および Luebke, *The Peptide, Academic Press*,
また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、
液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製単離することができる。
上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩
に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換する
ことができる。

[0 0 1 1]

【0011】 ペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンジルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂等である。

脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル- F_m エニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のペプチドを取得する。あるいはクロロトリペチドを取り出し、更に常套手段で保護基を除去し目的のペプチドを得ることもできる。

{0012}

〔0012〕 上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑製添加剤(例えば、HOBr、HOObtなど)とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBrエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチドの縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどのアルキル類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、の三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエ斯特類あるいはアセチルイミダゾールを用いて未だ十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

【0013】

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、クーノイ、チルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C₁-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチルボニル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオ、フタロイド、カルボキシル基の保護基としては、たとえばC₁₋₆アノール、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばC₁₋₆アノール基、C₇₋₁₄アラルキル基、2-アダマンチル、4-ニトロキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、フェナシルおよびベンジルオロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、ターシャリープトキシカルボニルヒドロラジド、トリチルヒドロカルボニルヒドロラジドなどが挙げられる。

ラジドなどが挙げられる。セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C_{1-6})アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえば Bz_1 、 C_1-Bz_1 、 2 -ニトロベンジル、 Bz_1-Z 、 t -ブチルなどが挙げられる。
ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、 Tos 、4-メトキシ-2, 3, 6-

トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、ノブド、活性エステル [アルコール (たとえば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、 HONB 、 N-ヒドロキシスクシミド 、 N-ヒドロキシフタルイミド 、 HO フェノール、 Bt) とのエステル] などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

[0014]

【0014】 保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばPd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルホン酸、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤フイド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールの添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

アなどによるアルカリ処理によっても除去される。原料の反応に間与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基の除去、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

。ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができるもの。

る。ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

[0015]

重合物または供重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。
出証特2004-3106809

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどジアゾニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデビトなどのジアルデヒドのジアゾニウム化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール化合物、N, N'-オーフェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、ア基同志を架橋するN, N'-オーフェニレンジマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を基と架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を有する活性エステル試薬（例えば架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬など）を反応させた後、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル (SPDP) など）を反応させた後、還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

[0016]

(2) モノクローナル抗体の作製

(2) モノクローナル抗体の作製
ヒトZAQL-2抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与され、抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全アジュバントを投与してもよい。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウスが好ましく用いられる。

はマウスが好ましく用いられる。モノクローナル抗体の作製に際しては、ヒトZAQL-2抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、本発明の抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗ヒトZAQL-2抗体価の測定は、例えば後記の標識化ヒトZAQL-2と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 [Nature、256巻、495頁 (1975年)] に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは、PEGなどが用いられる。骨髄腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが多くはPEGなどが用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髄細胞数との好ましい比率は、通常1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、通常20～40℃、好ましくは30～37℃、通常1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

10017

テインAまたはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など]に従って行われる。

以上のようにして、ハイブリドーマ細胞を温血動物の生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から抗体を採取することによって、本発明の抗体を製造することができる。

なお、(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドの一部領域と反応する本発明の抗体を產生するハイブリドーマ、および(b)上記ポリペプチドとは反応するが、その一部領域とは反応しない本発明の抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングは、例えば、その一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが產生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

【0018】

以下に、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法（免疫測定法）について、より詳細に説明する。

本発明の抗体を用いることにより、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドの測定または組織染色などによる検出を行なうことができる。これらの目的に、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子のF(ab')2、Fab'またはFab画分なども用いてもよい。

本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ヒトZAQL-2量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、サンドイッチ法、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリーなどが用いられるが、感度、特異性の点で後述するサンドイッチ法、競合法が、特にサンドイッチ法が好ましい。

【0019】

(1) サンドイッチ法

担体上に不溶化した本発明の抗体、標識化された本発明の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することにより被検液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を定量する。好ましくは、

(i) 担体上に不溶化したZAL2-103aで標示されるモノクローナル抗体、標識化されたZAL2-106aで標示されるモノクローナル抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

(ii) 担体上に不溶化したZAL2-106aで標示されるモノクローナル抗体、標識化されたZAL2-103aで標示されるモノクローナル抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法などが挙げられる。

【0020】

サンドイッチ法においては、不溶化した本発明の抗体に被検液を反応（1次反応）させた後、不溶化担体上の標識剤、さらに標識化された本発明の抗体を反応（2次反応）させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するの活性を測定することにより被検液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する量を定量することができる。1次ポリペプチドまたはその塩（好ましくはヒトZAQL-2）の量を定量することができる。1次反応と2次反応は同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。サンドイッチ法による測定法においては、例えば、1次反応で用いられる抗体がZAL2-103aで標示されるモノクローナル抗体である場合は、2次反応で用いられる抗体はZAL2-106aで標示されるモノクローナル抗体が好ましく、1次反応で用いられる抗体がZAL2-106aで標示されるモノクローナル抗体である場合は、2次反応で用いられる抗体は、ZAL2-103aで標示されるモノクローナル抗体が用いられる。これらの抗体は、例えば西洋ワサビ3aで標示されるモノクローナル抗体が用いられる。

ーオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) で標識化されて用いられるのが好ましい。

【0021】

(2) 競合法

本発明の抗体、被検液および標識化された配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の割合を測定することにより、被検液中の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を定量する。

本反応法は、例えば、固相化法を用いて行う。

具体例としては、抗マウス IgG抗体 (ICN/CAPPEL社製) を固相化抗体として用い、この固相化抗体の存在するプレートに、(i) 本発明の抗体 (例、ZAL2-103aまたはZAL2-106a) 、(ii) HRPで標識化された配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、および (iii) 被検液を添加し、反応後、固相に吸着したHRP活性を測定し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を定量する。

(3) イムノメトリック法

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化された本発明の抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは被検液中の抗原と過剰量の標識化された本発明の抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化された本発明の抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

(4) ネフロメトリー

ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0022】

上記 (1) ~ (4) において、標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、ラントニド元素などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが、酵素としては、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが、蛍光物質としては、シアニン蛍光色素 (例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7 (アマシャムバイオサイエンス社製) など)、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコンなどの合成樹脂あるいはガラスなどが挙げられる。

【0023】

これら個々の免疫学的測定法を本発明法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる [例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」 (講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」 (講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」 (医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」 (第2版) (医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「

酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）など参照】。したがって、本発明のサンドイッチ免疫測定法などによる測定系を構築する場合、その方法は後述する実施例に限定されない。

[0 0 2 4]

することができる。
本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の摂食障害の治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、非経口投与するが、い場合には、その症状に応じて增量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

する剤形として提供される。
すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。

ぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。この組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。いられる無菌の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液注射用の水性液としては、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコ等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレン glycol、ポリエチレン glycol）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記の坐剤を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製した。活性成分の投与量に適合するような投薬単

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適応する投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤等が例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常約5～500mg、とりわけ注射剤では約5～100mg、その他の剤形では約10～250mgの上記抗体制が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生しない限り他の活性成分を含有してもよい。

[0025]

【0023】 本発明の明細書において、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

T F A	トリフルオロ酢酸
D M F	N,N-ジメチルフォルムアミド
G l y	グリシン
A l a	アラニン
V a l	バリン
L e u	ロイシン
I l e	イソロイシン
S e r	セリン
T h r	スレオニン
C y s	システィン
M e t	メチオニン
G l u	グルタミン酸
A s p	アスパラギン酸
L y s	リジン
A r g	アルギニン
H i s	ヒスチジン

Phe	：フェニルアラニン
Tyr	：チロシン
Trp	：トリプトファン
Pro	：プロリン
Asn	：アスパラギン
Gln	：グルタミン
SPDP	：3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル
GMBS	：N-(4-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド
BSA	：ウシ血清アルブミン
BTG	：ウシチログロブリン
EIA	：エンザイムイムノアッセイ
HPLC	：逆相高速液体クロマトグラフィー
HRP	：西洋ワサビパーオキシダーゼ
FBS	：ウシ胎児血清
d-FBS	：透析済みウシ胎児血清
TMB	：(3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン)
H/HBSS	：ヘペスバッファードハンクスバランス溶液
EDTA·Na	：エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸ニナトリウム塩二水和物

【0026】

本明細書において用いられる配列番号は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：1〕

ヒトZAQL-2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒトZAQL-1のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

ヒトZAQL-1のアミノ酸配列を示す。配列番号：2で表されるアミノ酸配列の48番目のValがIleに置換されている。

【0027】

後述の実施例1で得られたハイブリドーマ細胞ZAL2-103は、2003年7月18日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8431として寄託されている。

後述の実施例1で得られたハイブリドーマ細胞ZAL2-106は、2003年7月18日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8432として寄託されている。

なお、各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については細胞名の後に「a」を付けた形で表す。

【0028】

以下に、実施例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例で用いたヒトZAQL-2（配列番号：1）は、WO 02/62944号公報の参考例1に記載の方法に従って得た。

実施例で用いたヒトZAQL-1（配列番号：2）は、WO 02/06483号公報の参考例1に記載の方法に従って得た。

【0029】

実施例1

抗ヒトZAQL-2モノクローナル抗体の取得

(1) 免疫

8週令のBALB/C雌マウスにヒトZAQL-2を、それぞれ約80μg/匹となるよう、完全フロイントアジュvantととともに皮下免疫した。以後3週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュvantとともに2~3回追加免疫した。

(2) 西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 標識化ヒトZAQL-2の作製
ヒトZAQL-2とHRP (酵素免疫測定法用、ベーリンガーマンハイム社製) とを架橋し、酵素免疫測定法 (EIA) の標識体とした。

HRP 8.5mg (213nmol) を0.95mlの0.1M塩化ナトリウムを含む0.02Mリン酸緩衝液 (pH6.8) に溶解させ、SPDP 1.99mgを含むDMF溶液50μlと混合し、室温で60分間反応させた。さらに、9.25mgのジチオスレイトールを含む0.1M酢酸緩衝液 (pH4.5) 0.5mlを加え、室温で30分反応させた後、セファデックスG-25カラム (溶離液、2mM EDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0) で分離し、SH基の導入されたHRPを得た。ヒトZAQL-2 2mgを0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0) で分離し、SH基の導入されたHRPを得た。このようにして作製された、SHで分離し、マレイミド基の導入されたヒトZAQL-2を得た。このようにして作製された、SH基の導入されたHRP 1.67mg (41.4nmol) とマレイミド基の導入されたヒトZAQL-1 1.2mg (136nmol) とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲルAcA44 (LKB-ファルマシア社製) カラムで分画し、HRP標識化ヒトZAQL-2を得た。

【0030】

(3) ヒトZAQL-2を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

ヒトZAQL-2を3週間間隔で3回免疫を行い、その1週間後に眼底採血を行い血液を採取した。さらに血液を、4℃で12,000rpmで15分遠心した後、上清を回収し抗血清を得た。抗血清中の抗体価を下記の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製するため、まず、抗マウスイムノグロブリン抗体 (IgG画分、カッペル社製) を100μg/ml含む0.1M炭酸緩衝液 (pH9.6) 溶液を96ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注し、4℃で24時間放置した。次に、プレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH7.4) で洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため25%プロックエース (雪印乳業社製) を含むPBSを300μlずつ分注し、4℃で少なくとも24時間処理した。

得られた抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファーC [1% BSA、0.4M NaCl、0.05% 2mM EDTA・Na (DOJINDO社) を含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0] 50μl、およびバッファーCで希釈した複合体に対する抗血清100μlを加え、4℃で16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、上記(2)で作製したHRP標識化ヒトZAQL-2 (バッファーCで300倍希釈) 100μlを加え、室温で1日反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン)マイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム (KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC.、フナコシ薬品取り扱い) 100μlを加え室温で10分間反応させることにより測定した。反応を1Mリン酸100μlを加え停止させたのち、450nmの吸収をプレートリーダー (BICHROM ATIC、大日本製薬社製) で測定した。

結果を図1に示す。

免疫した8匹のマウス全ての、ヒトZAQL-2に対する抗血清中に、ヒトZAQL-2に対する抗体価の上昇が認められた。

【0031】

(4) モノクローナル抗ヒトZAQL-2抗体の作製

比較的高い抗体価を示したマウス (No.2とNo.4) に対して50~100μgの免疫原を生理食塩水0.2mlに溶解させたものを静脈内に接種することにより最終免疫を行なった。最終免疫4日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、イーグルズ・ミニマム・エッセンシャルメディア (MEM) に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た。細胞融合に用いる細胞として、BALB/Cマウス由来ミエローマ細胞P3-X63.Ag8.U1 (P3U1) を用いた (Current Topics in Microbiology and Immunology、81巻、1頁、1978年)。

細胞融合は、原法 (Nature、256巻、495頁、1975年) に準じて行なった。

脾臓細胞およびP3U1をそれぞれ、血清を含有しないMEMで3度洗浄し、脾臓細胞とP3U1数の比率を5:1になるよう混合して、800回転で15分間遠心を行い、細胞を沈殿させた。上清を充分に除去した後、沈殿を軽くほぐし、45%ポリエチレングリコール (PEG) 6000 (コッホライト社製) を0.3ml加え、37℃温水槽中で7分間静置して融合を行なった。融合後、

細胞に毎分2mlの割合でMEMを添加し、合計15mlのMEMを加えた後600回転15分間遠心して上清を除去した。この細胞沈殿物を10%牛胎児血清を含有するGITメティウム（和光純薬）（GIT-10% FCS）に、P3U1が1ml当たり 2×10^5 個になるように浮遊し、24穴マルチディッシュ（GIT-10% FCS）に、1ウェル1mlずつ192ウェルに播種した。播種後、細胞を37°Cで5%炭酸ガス（インプロ社製）に1ウェル1mlずつ192ウェルに播種した。播種後、細胞を37°Cで5%炭酸ガスインキュベーター中で培養した。24時間後、HAT（ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノブチミン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-3} M）を含んだGIT-10% FCS培地（HAT培地）を1ウェル当たり1mlずつ添加することにより、HAT選択培養を開始した。HAT選択培養は、培養開始3日後、6日後、9日後に旧液を1ml捨てた後、1mlのHAT培地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後9～14日で認められ、培養液が黄変したとき（約 1×10^6 cells/ml）上清を採取し、上記（3）に記載の方法に従って抗体価を測定した。

⁶セル/ml)、上清を採取し、上記(3)に記載の方法に従つて抗体画を測定し、ヒトZAQL-2を免疫したマウス由来のハイブリドーマの抗体産生細胞株を選択した例として、マウスNo.2とNo.4(図1参照)を用いて細胞融合を行い、得られたハイブリドーマの中から下記の計4種類のハイブリドーマを選択した[表1]。

[表1]

反応性 ¹⁾			
ハイブリドーマ株No.	ヒトZAQL-2	クラス/サブクラス	抗体名称
1	+	IgG1, κ	ZAL2-103a
2	+	IgG1, κ	ZAL2-106a
3	±	IgG2b, κ	ZAL2-85a
4	±	IgG1, κ	ZAL2-58a

1) 1 nMの抗原ヒトZAQL-2が存在した時

$$+ \therefore (B/B_0) < 0.50$$

$$\pm : 0.50 \leq (B/B_0) < 0.70$$

$$- : 0, 70 \leq (B/B_0)$$

B：抗原存在時の抗体に結合したHRP標識ヒトZQL-2量

B. : 抗原非存在時の抗体に結合したHR P 標識ヒトZAQL-2 量

[0032]

【0032】 次に、上記で得られたハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングに付した。クローニングに際しては、フィーダー細胞としてBALB/Cマウスの胸腺細胞を 5×10^5 個/ウェルになるように加えた。クローニング後、ハイブリドーマを、あらかじめミネラルオイル0.5mlを腹腔内投与されたマウス (BALB/C) に $1 \sim 3 \times 10^6$ セル/匹を腹腔内投与したのち、20日後に抗体含有腹水を採取した。

20日後に抗体含有腹水を採取した。モノクローナル抗体は、得られた腹水よりプロテイン-Aカラムにより精製した。腹水6～20mlを等量の結合緩衝液〔3.5M NaCl、0.05% NaN₃を含む1.5Mグリシン(pH9.0)〕で希釈したのち、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したリコンビナントプロテイン-A-アガロース(Repligen社製)カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液〔(0.05%NaN₃を含む0.1Mケン酸緩衝液(pH3.0)〕で溶出した。溶出液をPBSに対して4℃、2日間透析したのち、22μmのフィルター(ミリポア社製)により除菌濾過し、4℃あるいは-80℃で保存した。モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定に際しては、精製モノクローナル抗体

結合固相を用いるエンザイムーリングタイムノソーベントアッセイ (ELISA) 法を行った。すなわち、抗体 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 0.1M 炭酸緩衝液 (pH9.6) 溶液を96ウェルマイクロプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で24時間放置した。上記 (1) に記載の方法に従って、ウエルの余剰の結合部位をプロックエースでふさいだのち、アイソタイプタイピングキット (Mouse-Typer™ Sub-Isotyping Kit バイオラッド社製) を用いるELISAによって固相化抗体のクラス、サブクラスを調べた。取得した抗体4種はいずれもH鎖がIgG1、L鎖が κ であった

0 [0033]

案 例 2

方法例 2 競合法酵素免疫測定法

競合法酵素免疫測定法
ヒトZQL-2-BTGを免疫原として作製したモノクローナル抗体の反応特異性を以下の方法
により調べた。

により調べた。 まず、得られた4種類のモノクローナル抗体溶液の抗体価を上記実施例1-(3)記載の方法により調べ、競合法-EIAに用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約50%となる抗体濃度を決定した(約30~50ng/ml)。次に、上記実施例1-(3)記載の抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、(i)各モノクローナル抗体を50ng/mlとなるようバッファーCで希釈された抗ヒトZAQL-2抗体溶液50μl、(ii)バッファーCで希釈されたヒトZAQL-1溶液50μlまたはヒトZAQL-2溶液50μl、(iii)および上記実施例1-(3)で得られたHRP標識化ヒトZAQL-2(バッファーCで400倍希釈)50μlを抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに加え、4℃で16時間反応させた。反応後、PBSで洗浄したのち抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレート上の酵素活性を、上記実施例1-(3)記載の方法により測定した。

結果を図 5 に示す。

結果を図5に示す。いずれの抗体も、ヒトZAQL-2との反応性を有するが、ヒトZAQL-1に対しては反応性を有していないことがわかる。

例として、これらの中でヒトZAL2-2に対して最も高い反応性を示したモノクローナル抗体ZAL2-103aおよびZAL2-106aの競合法-EIAの結果を、図6に示す。

ZAL2-103aおよびZAL2-106aのヒトZAQL-1の標準曲線から、最大反応に対する割合(B/B_0)=0.5を与えるヒトZAQL-2濃度は、それぞれ0.8nMおよび3 nMであることが分かった。これらの結果から、ZAL2-103aおよびZAL2-106aは、ヒトZAQL-2に対して高い反応性を示しているものと考えられる。

【0 0 3 4】

実施例 3

実施例3 HRP標識化抗ヒトZAI-2モノクローナル抗体 (ZAL2-103a-HRP) の作製

HRP標識化抗ヒトZAL2-2モノクローナル抗体 (ZAL2-103a) を含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.8) に、GMBS 0.80 μ molを含むDMF 50 μ lを加え、室温で40分反応させた。反応液をセファデックスG-25カラム (溶離液、0.1Mリン酸緩衝液、pH6.7) で分離し、マレイミド基の導入された抗体画分 (6.99 mgを得た。次に、HRP 17.1 mg (428 nmol) を含む0.02Mリン酸緩衝液 (0.15M NaClも含む) (pH6.8) 1.14mlに、SPDP 6.42 μ molを含むDMF 60 μ lを加え、室温で40分反応させた。次に、64.2 μ molのジチオスレイトールを含む0.1M酢酸緩衝液 (pH4.5) 0.4mlを加え、室温で20分反応させた後、セファデックスG-25カラム (溶離液、2mM EDTAを含む) で分離し、SH基の導入されたHRP 9.8mgを得た。次に、SH基の導入された抗体画分3mgとを混合し、コロジオンバッグ入されたHRP 8mgとマレイミド基の導入された抗体画分3mgとを混合し、コロジオンバッグ (ザルトリウス社製) で約0.5mlにまで濃縮したのち、4°Cで16時間放置した。反応液を0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.5) で平衡化したSephadrylS-300HRカラム (Pharmacia社製) に供し、ZAL2-103a-HRP複合体画分を精製した。

[0035]

実施例 4

サンドイッチ法-EIA

実施例 1 で得られた精製したモノクローナル抗体ZAL2-106aを15 μ g/ml含む0.1M炭酸緩衝液でサントリソーラ法-EIA実験を行った。

出証特2004-3106809

衝液 (pH9.6溶液) を、96ウェルマイクロプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、4°Cで24時間放置した。ウェルの余剰の結合部位をPBSで4倍希釈したプロックエース $400\mu\text{l}$ を加え不活化した。

上記調製済みプレートに、バッファーCを含む0.02Mリン酸緩衝液 (pH7) で希釈したヒトZAQL-2またはヒトZAQL-1標準液を $100\mu\text{l}$ を加え、4°Cで24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例3で作製したZAL2-103a-HRP (バッファーCで10,000倍希釈) $100\mu\text{l}$ を加え、4°Cで24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、実施例1- (3) 記載の方法によてTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン)マイクロウェルパーオキシダーゼ基質シリム (フナコシ) を用いて固相上の酵素活性を測定した (酵素反応20分)。

結果を図7に示す。

このサンドイッチ法-EIAは、ヒトZAQL-2を 0.3 fmol/mL で検出することが可能であり、ヒトZAQL-1とは 10000 fmol/mL まで反応しなかった。したがって、固相抗体としてZAL2-106aを用い、標識体としてZAL2-103a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAは、ヒトZAQL-2を極めて高精度にかつ極めて選択的に検出することが可能であるとわかった。

【0036】

実施例5

抗ZAL2-モノクローナル抗体によるヒトZAQL-2の生物活性の中和作用

抗ZAL2-モノクローナル抗体によるヒトZAQL-2の生物活性の中和作用を、W0 02/0648

ZAL2-85a、ZAL2-103aおよびZAL2-106aによるヒトZAQL-2に対する中和活性を、W0 02/0648 3号公報公報の実施例3-5記載のI5E発現CHO細胞を用いた細胞内 Ca^{2+} イオン濃度上昇活性を指標に、FLIPR (Molecular Devices社) を用いて測定を行った。

I5E発現CHO細胞を、 $1.2 \times 10^5\text{ cells/ml}$ となるように透析処理済ウシ胎児血清 (以後dFBS) (JRH BIOSCIENCES社) を含むDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地 (日本製薬株式会社) (10% dFBS-DMEM) に懸濁し、FLIPR用96穴プレート (Black plate clear bottom、Coster社) に分注器を用いて各ウェルに $200\mu\text{l}$ ずつ播種し ($4 \times 10^4\text{ cells}/200\mu\text{l}$ ウェル) 、5% CO_2 インキュベーター中にて37°Cで一晩培養した後用いた (以後、細胞プレートとする)。FLIPRアッセイバッファー [ニッスイハンクス2 (日本製薬株式会社) 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77g、6M水酸化ナトリウム溶液でpH7.4に合わせた後、1Lにフィルアップし、フィルター滅菌処理したもの] 20ml、250mM Probenecid (プロベセシド、シグマ社)、200 μl 、ウシ胎児血清 (FBS) 210 μl を混合した。また、F10 3-AM (同人化学研究所) 2バイアル (50 μg) を、ジメチルスルフォキサイド 40 μl 、Pluronic acid (Molecular Probes社) 40 μl に溶解し、これをH/HBSS (ヘペスバッ20% Pluronic acid (Molecular Probes社) 9.8g、炭酸ファードハンクスバランス溶液 (ニッスイハンクス2 (日本製薬株式会社) 0.35g、HEPES 4.77g、水酸化ナトリウム溶液でpH7.4に合わせた後、水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77g、水酸化ナトリウム溶液でpH7.4に合わせた後、250 mM Probenecid 200 μl 、ウシ胎児血清 (FBS) 200 μl (フィルター滅菌処理)) 20 ml、250 mM Probenecid-FBS溶液に加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を1よりなるH/HBSS-Probenecid-FBS溶液に加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに、各ウェル $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中にて37°Cで1時間インキュベートした (色素ローディング)。ZAL2-85a、ZAL2-103aまたはZAL2-106aを時間インキュベートした (色素ローディング)。ZAL2-85a、ZAL2-103aまたはZAL2-106aを $3.3 \times 10^{-11}\text{ M}$ と37°Cで1時間インキュベーション後、各フラクション5 μl を、FLIPR用96穴プレート (V-Bottomプレート、Coster社) へ移した (以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、Hanks'/HBSSに2.5mM Probenecidを加えた洗浄バッファーで、プレートウォッシャー (Molecular Devices社) を用いて細胞プレートを4回洗浄し、洗浄後 $100\mu\text{l}$ の洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをFLIPRにセットし、測定を行った (FLIPRにより、サンプルプレートから50 μl のサンプルが細胞プレートへと移される)。

結果を図8に示す。

これより、ZAL2-103aは、ヒトZAQL-2 ($3.3 \times 10^{-11}\text{ M}$) の活性を、等モル濃度の $3.3 \times 10^{-11}\text{ M}$ で約97%抑制したことがわかる。また、ヒトZAQL-2の活性に対し、ZAL2-106aは10倍濃度 ($3.3 \times 10^{-10}\text{ M}$) で、ZAL2-85aは100倍濃度 ($3.3 \times 10^{-9}\text{ M}$) で、95%以上の中和活性をそれぞれ示した。

以上のことから、特にZAL2-103aは、ヒトZAQL-2と等モル濃度でヒトZAQL-2の細胞内Ca²⁺上昇活性を中和することが明らかとなり、中和抗体として使用可能である。

【0037】

実施例6

血漿中のヒトZAQL-2の定量

ヒト血漿を、同量のバッファーCで2倍希釈し、上記実施例4記載のサンドイッチ法-EIAにより、ヒトZAQL-2を定量した。

結果を表2に示す。

【表2】

ヒト血漿中ZAQL-2免疫活性		
N. o.	男性 (fmol/ml)	女性 (fmol/ml)
1	2.41	5.68
2	3.42	53.54
3	4.56	0.38
4	1.69	0.35
5	0.94	6.84
6	1.23	4.45
7	1.46	6.39
8	1.45	1.54
9	0.83	
10	1.53	

ヒト血漿(1ml)中のヒトZAQL-2量：

男性；1.95 ± 0.38 fmol/ml (mean ± SEM, n = 10)

女性；9.90 ± 6.30 fmol/ml (mean ± SEM, n = 8)

これより、この測定系は、血漿中のヒトZAQL-2の変動を正確に定量することができるこ
とがわかった。

【0038】

実施例7

ヒト血漿中のヒトZAQL-2の逆相高速液体クロマトグラフィーによる検出

実施例6に記載の、ヒト血漿中に含まれるヒトZAQL-2免疫活性を同定するため、ヒト血
漿2.5mlにアセトニトリルを5ml添加して混和後、遠心分離(15,000rpm, 5分)を行い、タ
ンパク質の除去を行った。上清を凍結乾燥後、この画分を濃縮後ODS-80TMを用いる逆相HPLC
によって分画した。

カラム条件：

カラム：ODS-80TM (4.6 x 250 mm)

溶離液：A液 (0.05% トリフルオロ酢酸含有 5% アセトニトリル)

B液 (0.05% トリフルオロ酢酸含有 60% アセトニトリル)

溶出方法：アセトニトリル濃度を最初の5分間に5%から30%まで上昇させ、次に30
分間かけて30-40%に直線的に上昇させた。

流速：1.0 ml/分

分画：0.5ml/tube

溶出画分を凍結乾燥したのち、250 μ lのバッファーCに溶解させ、実施例4記載のサンドイツ法-EIAに供した。

結果を図9に示す。血漿中のヒトZAQL-2の免疫活性はほとんど標準品ヒトZAQL-2の溶出位置に検出された（回収率66%）ことから、該サンドイッチ法-EIAが、ヒトZAQL-2を検出していることが確認された。

これより、この測定系は、血漿中のヒトZAQL-2の変動を研究する際の重要な手段となりうることがわかる。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】ヒトZAQL-2を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定結果を表す。図中、-◇-はマウスNo.1、-□-はマウスNo.2、-△-はマウスNo.3、-○-はマウスNo.4、-◆-はマウスNo.5、-■-はマウスNo.6、-▲-はマウスNo.7、-●-はマウスNo.8を表す。

【図2】ヒトZAQL-2を免疫したマウス由来のハイブリドーマが、抗体を産生している状態（吸光分析の結果）を表す。

【図3】ヒトZAQL-2を免疫したマウス由来のハイブリドーマが、抗体を産生している状態（吸光分析の結果）を表す。

【図4】ヒトZAQL-2を免疫したマウス由来のハイブリドーマが、抗体を産生している状態（吸光分析の結果）を表す。

【図5】ヒトZAQL-2を免疫したマウス由来のハイブリドーマが産生した抗体のヒトZAQL-2とヒトZAQL-1との反応性を（吸光分析の結果）を表す。図中、-◆-はZAL2-85aとヒトZAQL-2との反応性を、-◇-はZAL2-85aとヒトZAQL-1との反応性を、-■-はZAL2-103aとヒトZAQL-2との反応性を、-□-はZAL2-103aとヒトZAQL-1との反応性を、-▲-はZAL2-106aとヒトZAQL-2との反応性を、-△-はZAL2-106aとヒトZAQL-1との反応性を、-●-はZAL2-58aとヒトZAQL-2との反応性を、-○-はZAL2-58aとヒトZAQL-1との反応性を表す。

【図6】ZAL2-103aおよびZAL2-106aのヒトZAQL-2に対する競合法-EIAの結果を表す。図中、-▲-はZAL2-103a、-■-はZAL2-106aの反応性を表す。

【図7】ZAL2-106aおよびZAL2-103a-HRPを用いたサンドイッチ法EIAの結果を表す。図中、-●-はヒトZAQL-2の反応性を、-○-はヒトZAQL-1の反応性を表す。本測定系の非特異的な吸光度(0.1>)をblankとして図中に□として示す。

【図8】ZAL2-85a、ZAL2-103aまたはZAL2-106aの各共存時におけるI5E発現CHO細胞を用いた細胞内Ca²⁺イオン濃度上昇活性に対する中和作用を表す。ヒトZAQL-2および各抗体を、室温で1時間反応させた後の細胞内Ca²⁺イオン濃度上昇活性を示す。図中、白棒はZAL2-85aを、黒棒はZAL2-103aを、斜線棒はZAL2-106aをヒトZAQL-2と共にさせた時のI5E発現CHO細胞における細胞内Ca²⁺イオン濃度上昇活性のコントロール（抗体非添加時）に対する割合を示す。

【図9】逆相HPLCを用いて分画したヒト血漿中のヒトZAQL-2免疫活性の溶出位置を表す。矢印は、標準品ヒトZAQL-2の溶出位置を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takada Chemical Industries, Ltd.
<120> Antibody and its use
<130> B03221
<160> 3

<210> 1
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 1
 Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly
 5 10 15
 Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr
 Met Cys Cys 20 25 30
 Pro Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val
 35 40 45
 Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly
 50 55 60
 Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 Lys

```

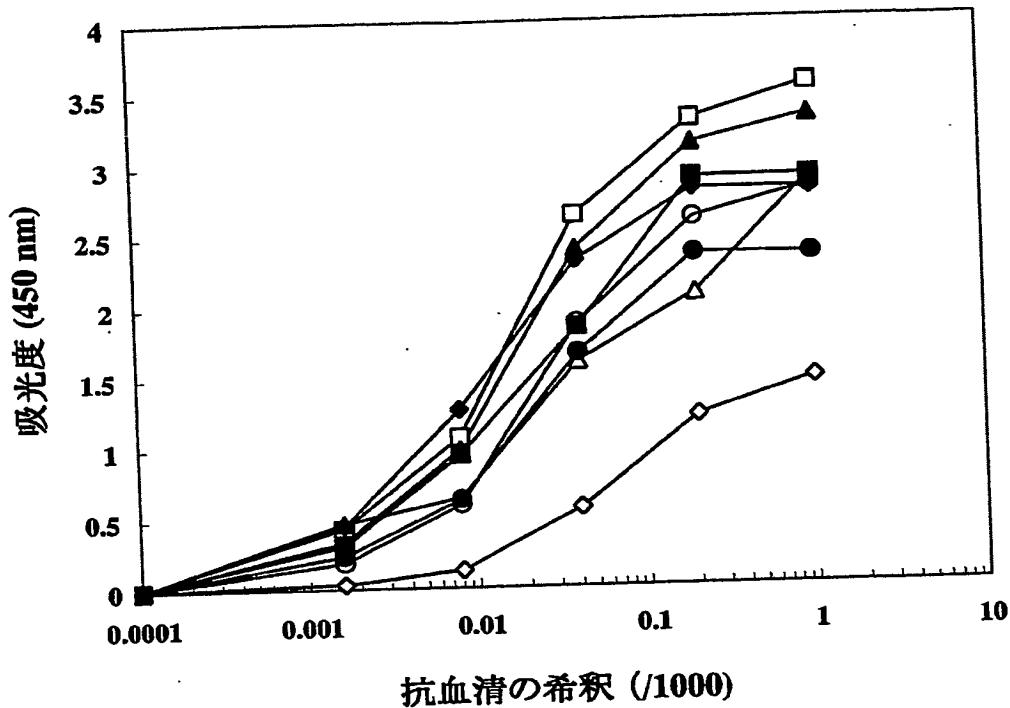
<210> 2
<211> 86
<212> PRT
<213> Human
<400> 2
Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
      5           10          15
Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
      20          25          30
Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val
      35          40          45
Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
      50          55          60
Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
      65          70          75          80
Leu Lys Asn Ile Asn Phe
      85

```

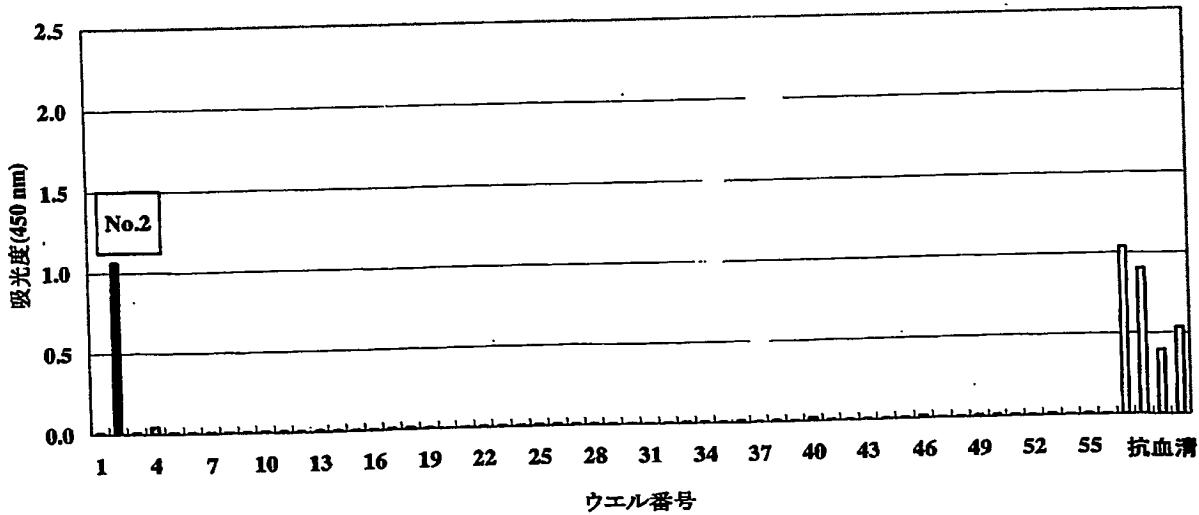
<210> 3
<211> 86
<212> PRT
<213> Human
<400> 3
Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
5 10 15
Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr

20 25 30
Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Ile
35 40 45
Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
50 55 60
Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
65 70 75 80
Leu Lys Asn Ile Asn Phe
85

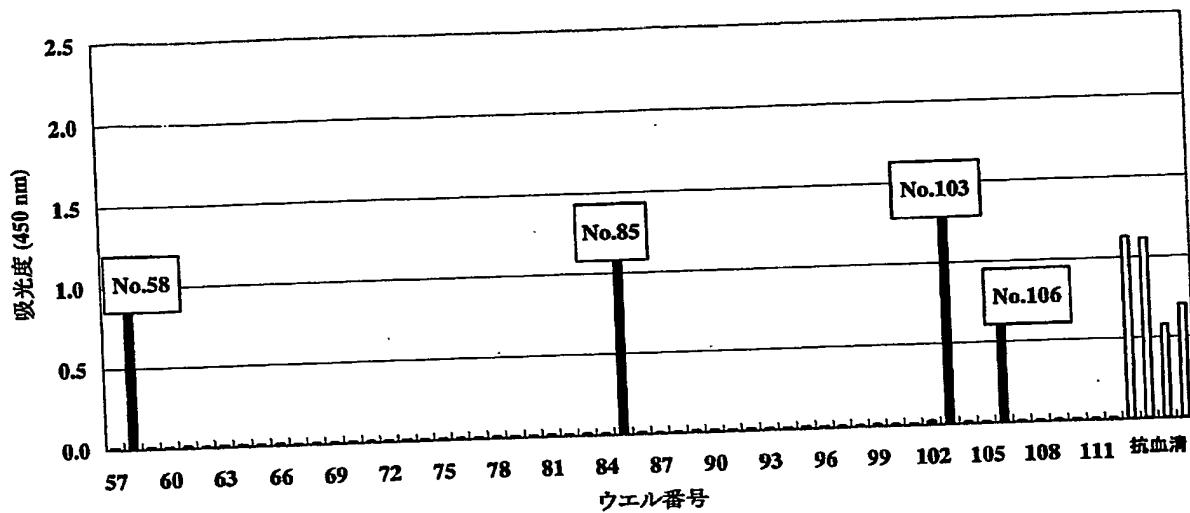
【書類名】図面
【図1】



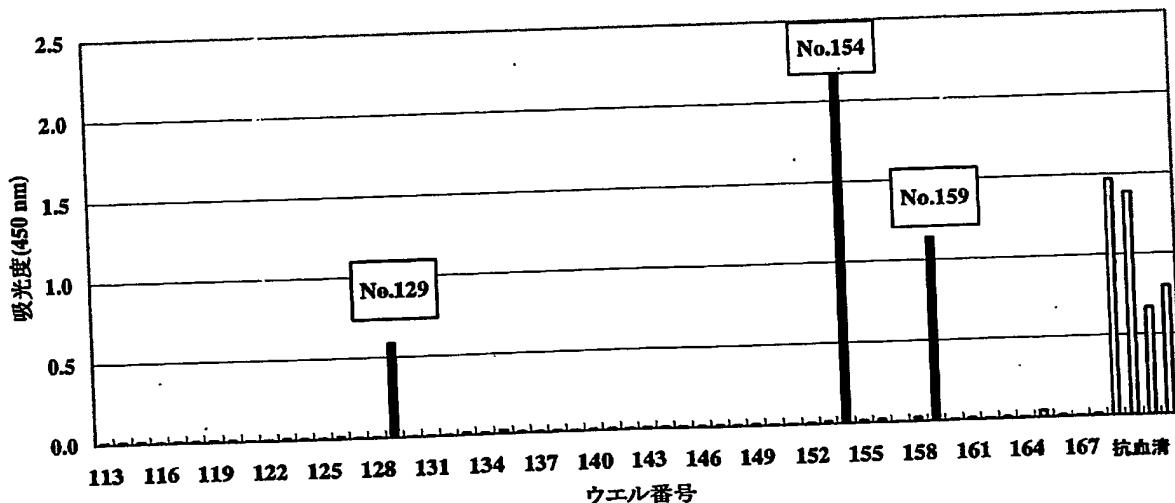
【図2】



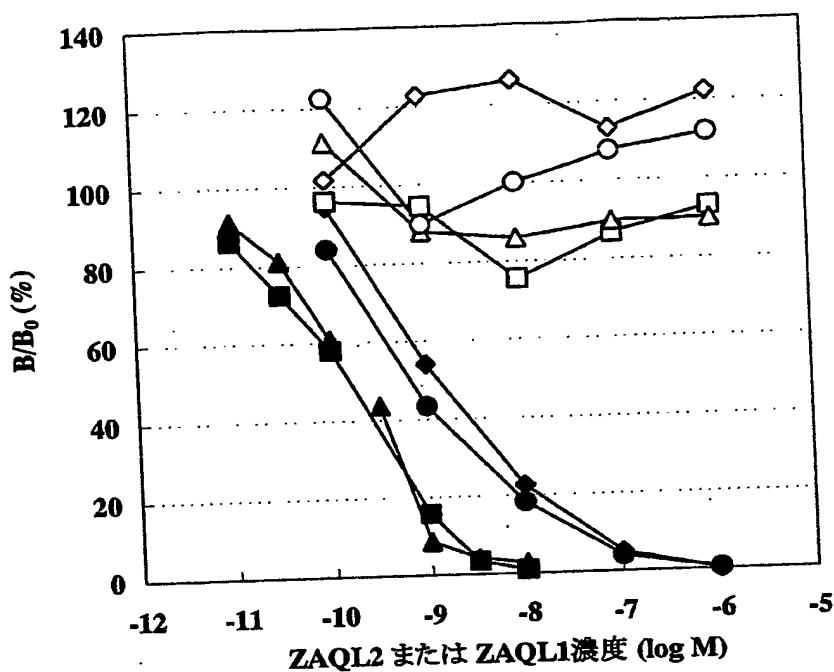
【図3】



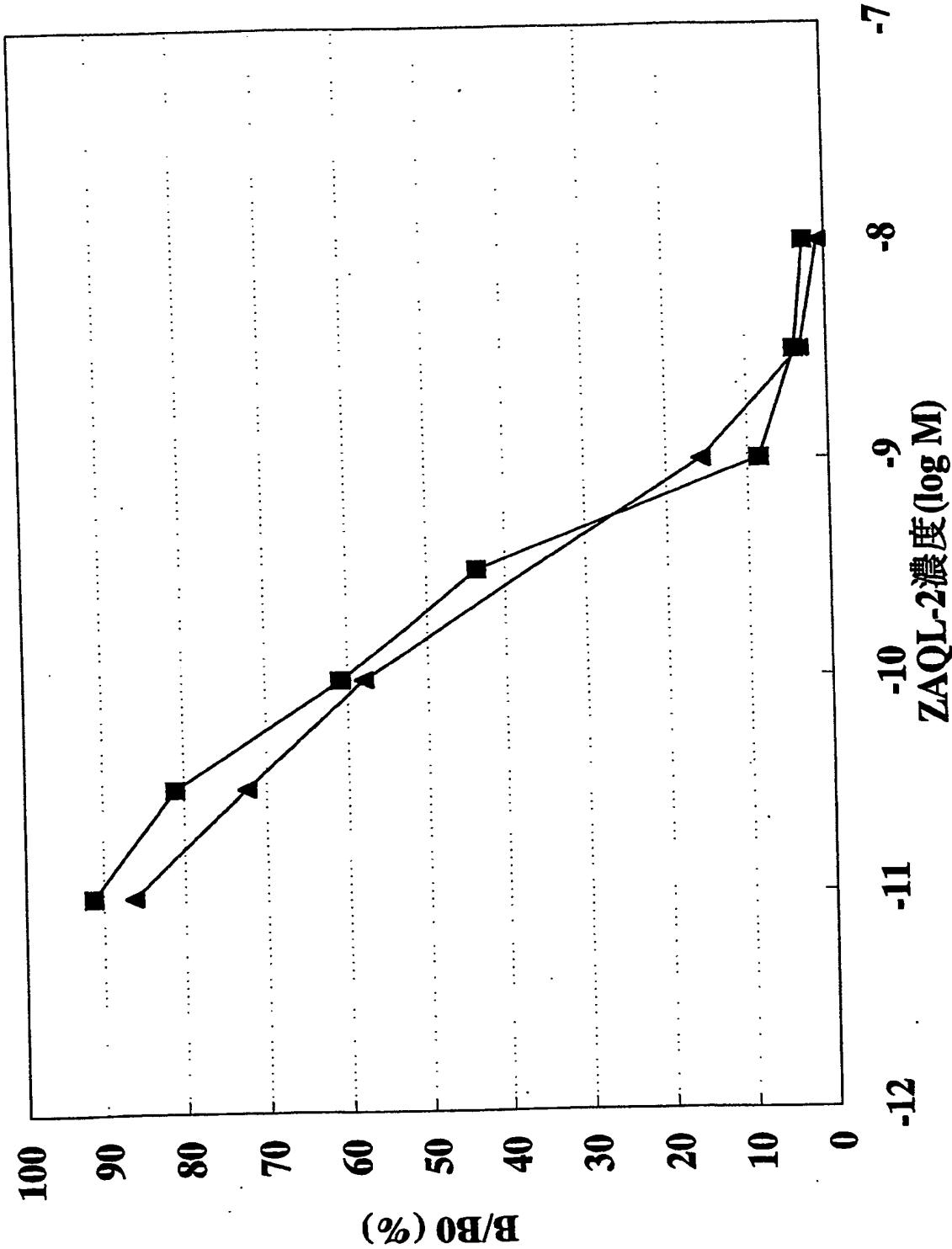
【図4】



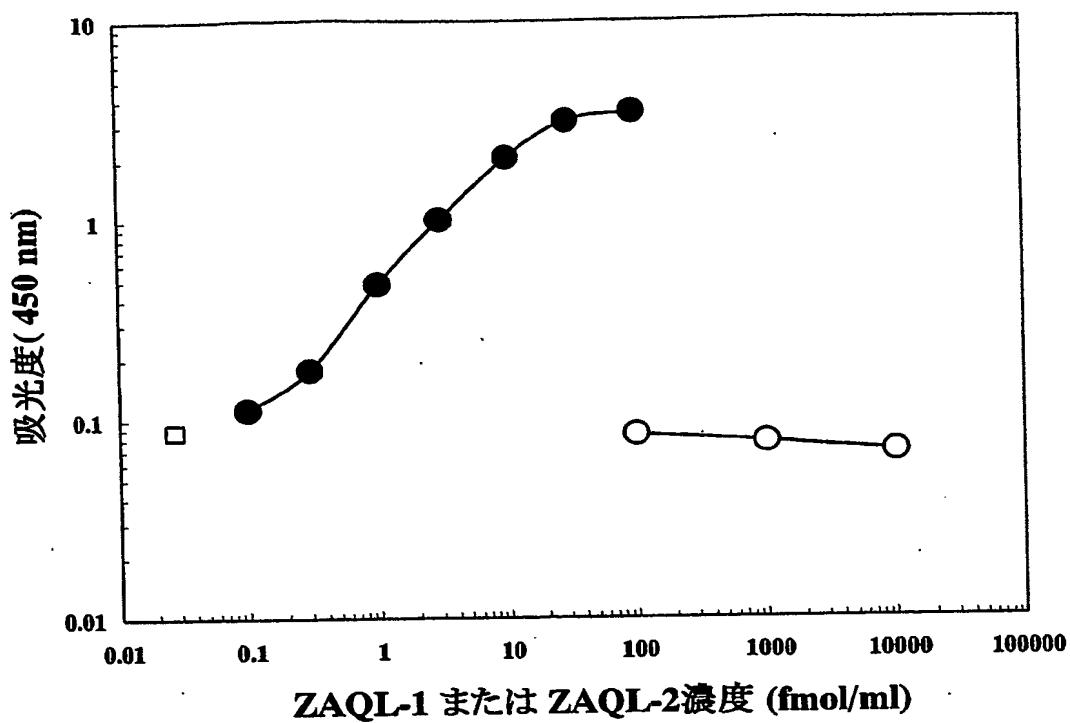
【図5】



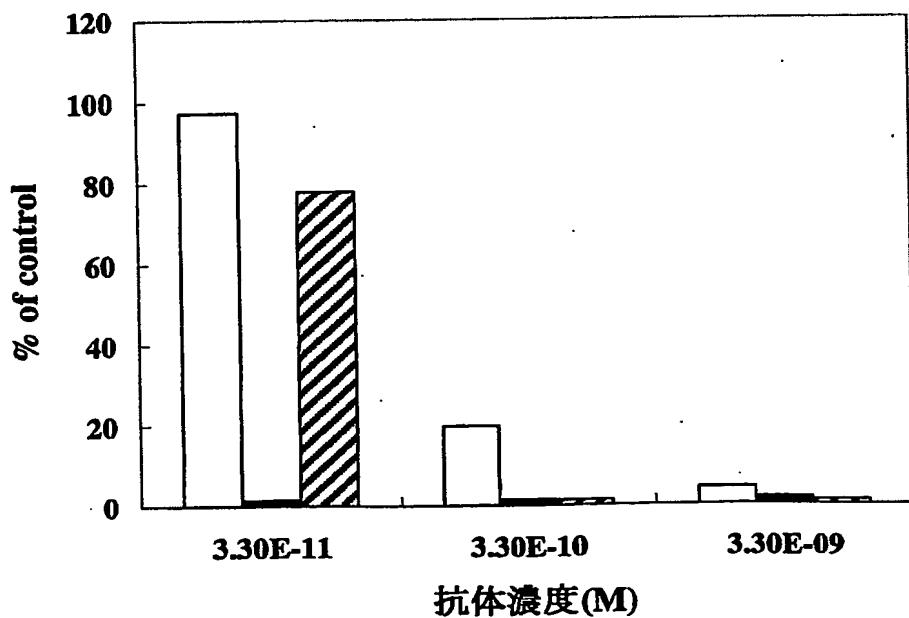
【図6】



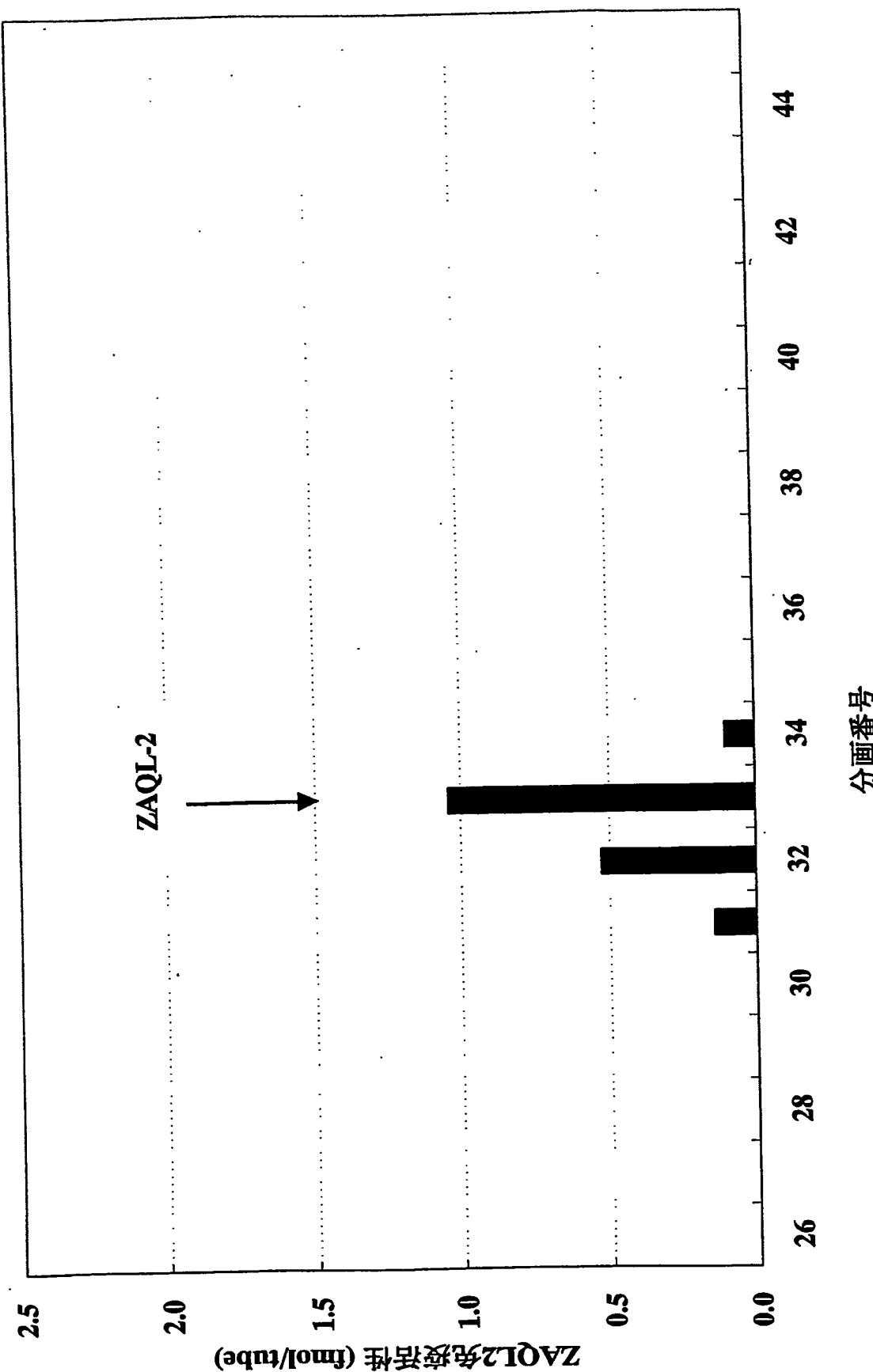
【図7】



【図8】



【図9】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 ヒトZAQL-2が関与する疾患等の治療剤、予防剤、診断薬の開発に有用な新規抗体および該抗体を用いたZAQL-2の定量法などの提供。

【解決手段】 ヒトZAQL-2またはその誘導体に特異的に反応する抗体、該抗体を用いたZAQL-2の定量方法、および該抗体を含有してなる医薬等。

【選択図】 なし

特願 2003-361639

出願人履歴情報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏名 武田薬品工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.